

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-248578  
(43)Date of publication of application : 22.09.1998

---

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
C07H 21/04  
C12N 1/21  
//(C12N 15/09  
C12R 1:01 )  
(C12N 1/21  
C12R 1:01 )

---

(21)Application number : 09-065618 (71)Applicant : NITTO CHEM IND CO LTD  
(22)Date of filing : 05.03.1997 (72)Inventor : MIZUMURA YURIE  
TO FUJIO

---

**(54) EXPRESSION VECTOR FOR BACTERIUM OF GENUS RHODOCOCCUS**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a general-purpose expression vector for a bacterium of the genus Rhodococcus, containing a mutant type regulatory factor having actions on constituent activation of a nitrilase gene promoter and capable of highly expressing the objective gene.

**SOLUTION:** This expression vector for a bacterium of the genus Rhodococcus comprises a DNA region capable of coding a regulatory factor having actions on the activation of a nitrilase gene promoter, a nitrilase promoter gene DNA region undergoing the activation by the regulatory factor, a DNA region capable of proliferating in the bacterium of the genus Rhodococcus and a drug-resistant DNA region capable of functioning in the bacterium of the genus Rhodococcus. An exogenote is integrated into the expression vector for the bacterium of the genus Rhodococcus and made to coexist in the bacterial cell of the genus Rhodococcus to thereby enable the constituent expression of the exogenote.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 01.03.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-248578

(43)公開日 平成10年(1998)9月22日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 12 N 15/09  
C 07 H 21/04  
C 12 N 1/21  
// (C 12 N 15/09  
C 12 R 1:01)  
Z N A

識別記号  
Z N A

F I  
C 12 N 15/00  
C 07 H 21/04  
C 12 N 1/21

Z N A A  
B

審査請求 未請求 請求項の数 7 FD (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-65618

(71)出願人 000003953

日東化学工業株式会社

東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

(22)出願日 平成9年(1997)3月5日

(72)発明者 水村 由利江

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日  
東化学工業株式会社中央研究所内

(72)発明者 湯 不二夫

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日  
東化学工業株式会社中央研究所内

(54)【発明の名称】 ロドコッカス属細菌用発現ベクター

(57)【要約】

【解決手段】 ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域、該調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域、ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域およびロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域を含んでなるロドコッカス属細菌用発現ベクター。

【効果】 ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属細菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(1)～(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクター。

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

(2) (1)の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

【請求項2】 調節因子が配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドの2成分より構成される請求項1記載の発現ベクター。

【請求項3】 ポリペプチドをコードする遺伝子が配列番号3および配列番号4の塩基配列を有する請求項2記載の発現ベクター。

【請求項4】 ロドコッカス属細菌細胞内で複製増殖可能なDNA領域がプラスミドpRC001、pRC002、pRC003およびpRC004からなる群から選ばれる少なくとも1種のプラスミド由来である請求項1記載の発現ベクター。

【請求項5】 薬剤耐性DNA領域がトランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子からなる請求項1記載の発現ベクター。

【請求項6】 請求項1～5に記載の発現ベクターにニトリルヒドラターゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は構成的に外来遺伝子の発現を可能とするロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクターに関する。詳しくは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域、調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域、ロドコッカス属細菌内で複製可能なDNA領域および薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域を含有する発現ベクター、ならびにこの発現ベクターにニトリルヒドラターゼ遺伝子を組み込んだプラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ロドコッカス属に属する微生物は、その物理的強度や酵素等を細胞内に多量蓄積する能力から、産業的に有用な微生物触媒として知られ、例えば、ニトリル類の酵素的水和または加水分解によるアミドまたは酸の生産等に利用されている(特開平2-470、特開平3-251192参照)。また、これらの酵素を含む微生物触媒

を、遺伝子組換えの方法によりさらに有用なものに改良する試みがなされている(特開平4-211379、特開平6-25296、特開平6-303971参照)。さらに、ロドコッカス属に属する微生物の遺伝子操作を効率的に押し進めるために、宿主～ベクター系の開発が進められており、新規なプラスミドの探索(特開平4-148685、特開平4-330287、特開平7-255484、特開平 参照)やベクターの開発(特開平5-64589、特開平8-56669、Journal of Bacteriology 170, 638-645 (1988)、米国特許4,920,054)など

10 が行われている。

【0003】 本発明者らは、すでにロドコッカスエリスロポリス(*Rhodococcus erythropolis*)SK92株からニトリラーゼ遺伝子およびその調節遺伝子をクローニングし、複合プラスミドベクターpK4を用いてロドコッカス属体内での発現を可能とした(特開平8-173169参照)。さらに、ニトリラーゼ発現の構成化した変異株SK92-B1株の構成化に関わる変異調節因子をコードする遺伝子を誘導型ニトリラーゼ産生細菌内に導入することにより、誘導物質を添加することなくニトリラーゼを得ることを可能にした(特開平9-23832号公報参照)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これまでロドコッカス属の汎用的な発現ベクターは知られておらず、遺伝子を高発現させるための新しいベクターの開発が望まれていた。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】かかる状況下、鋭意検討を行った結果、本発明者らは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを構成的に活性化する作用を有する変異型調節因子を含む汎用的で且つ目的とする遺伝子を高発現させ得るロドコッカス細菌用発現ベクターを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0006】 すなわち、本発明は、

1) 下記(1)～(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクター、  
(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化する作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

(2) (1)の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域  
(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

2) 上記発現ベクターにニトリルヒドラターゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド、ならびに、  
3) 上記組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物、に関する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 以下に、本発明を詳細に説明する。なお、本発明の調節因子はロドコッカスエリスロ

50 ポ

リス (*Rhodococcus erythropolis*) SK92株の変異株SK92-B1株由来のものであるが、SK92株由來の調節因子を用いることにより、誘導型の発現ベクターにすることができる。

【0008】SK92-B1株は *R. erythropolis* SK92-B1 (FERM P-14853)、SK92株は *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324) として、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その他、以下に説明するプラスミド等は以下のとおりである。すなわち、SK92株由來ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミド pSK106 (FERM P-14856)、SK92-B1株由來ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミド pBSK201 はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pSK106 (FERM P-14856)、SK92-B1株由來ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミド pBSK201 はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pBSK201 (FERM P-14855)、複合プラスミドベクター pK4 はこれを含有する形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC 12674/pK4 (FERM BP-3731)、ロドコッカス ロドクロウス J-1株のH型ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミド pNHJ10H はこれを含有する形質転換体 TG1/pNHJ10H (FERM BP-2777)、プラスミド pSJ023 は形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC12674/pSJ023 (FERM P-16108) として、同じく工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

#### 【0009】

【実施例】以下、実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### 【0010】実施例1

1) 調節遺伝子をコードする遺伝子を含むプラスミドの作製

##### 1-1) DNA断片の作製

SK92株由來のプラスミド pSK106 の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域 (約 3 kb EcoRV 断片) (特開平8-173169参照) を、SK92-B1株由來のプラスミド pBSK201 の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域 (約 3 kb EcoRV 断片) とを置き換えたプラスミド pBSK302 (特開平9-23832 参照) を制限酵素 SacI で切断後、7.3 kb の SacI 断片を 0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10 μl の pBSK302 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液 10 μl、滅菌水 78 μl、制限酵素 SacI 2 μl を加え 37°C にて 2 時間反応させた。ベクターに用いた pUC118 断片は次のように作製した。10 μl の pUC118 に対し 10 倍濃度制限酵素緩衝液 10 μl、滅菌水 77 μl、制限酵素 SacI 2 μl を加え 37°C で 2 時間反応後、フェノール処理、エタノール沈殿させた後乾燥して 50 μl の滅菌水に溶解した。さらに、アルカリリフォスタマー

ゼ (宝酒造株式会社) 1 μl、10 倍濃度緩衝液 10 μl、滅菌水 39 μl を加え 65°C で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

7.3 kb 断片を含む DNA 断片画分 1 μl を、上記のように調製した SacI 切断 pUC118 とライゲーションキット (宝酒造株式会社) を用いて 4°C で一晩反応させることにより pUC118 への挿入を行った。

【0011】1-2) 形質転換体の作製および組換え体 DNA の選別

10 大腸菌 JM109 株を LB 培地 (1.0% バクトリpton、0.5% バクトイーストエキス、0.5% NaCl) 1 ml に接種し 37°C、5 時間前培養し、この培養物 100 μl を SOB 培地 50 ml (2% バクトリpton、0.5% バクトイーストエキス、1.0 mM NaCl、2.5 mM KCl、1 mM MgSO<sub>4</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>) に加え、18°C で 20 時間培養した。遠心により集菌した後、冷 13 ml TF 液 (2.0 mM PIPES-KOH (pH 6.0)、2.0 mM KCl、1.0 mM CaCl<sub>2</sub>、4.0 mM MnCl<sub>2</sub>) を 13 ml 加え、0°C で 10 分放置後、再度遠心した。上澄を除いた後、沈殿した大腸菌に冷 TF 液 3.2 ml に懸濁し 0.22 ml のジメチルスルホキシドを加え 0°C で 10 分間放置した。こうして作製したコンピテントセル 200 μl に工程 1-1) で作製した組換え体プラスミドを含有する溶液 (DNA ライブラー) を 10 μl 加え、0°C で 30 分放置後、42°C で 30 秒間ヒートショックを与え 0°C で 2 分間冷却後、SOC 培地 (SOB 培地に 2.0 mM グルコースを加えたもの) を 0.8 ml 加え 37°C にて 60 分間振盪培養した。これを 200 μl ずつアンピシリン 100 μg/ml と 1 mM の IPTG (イソプロピル-β-チオガラクトシド) と 0.3 mM の X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) 含有の LB 寒天培地にまき、37°C で培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて青色発色の有無により目的の組換え体の選択を行った。

30 【0012】1-3) 組換え体プラスミドの調製

工程 1-2) で選択した形質転換体を 100 ml の LB 培地にて 37°C で一晩培養し、集菌後、滅菌水により洗浄し、溶液 I (2 mM グルコース、1.0 mM EDTA、2.5 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を 5 ml、リゾチームを 25 mg 加え、0°C で 30 分間放置した。溶液 II (1 N NaOH、5% SDS) を 10 ml 加え 0°C で 5 分間放置し、溶液 III (3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8)) を 7.5 ml 加え 0°C で 30 分間放置した。これを遠心し、その上澄みに 50 ml のエタノールを加えさらに遠心し上清を取り除き 5 ml の溶液 IV (1.0 mM 酢酸ナトリウム、5.0 mM Tris-HCl (pH 8.0)) とリボヌクレアーゼ A 液 (1.0 mg/ml) を 2.5 μl 加え室温で 20 分間放置した。これに 12 ml のエタノール

を加え遠心後沈殿したプラスミドを乾燥し滅菌水で溶解した。こうして得られたプラスミドをpBSK305と命名した。

【0013】2) ニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流へニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域が導入された、ロドコッカス属において複製可能な組換え体プラスミドの作製

工程1) で作製したプラスミドpBSK305のニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流にニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域を導入し、さらに、ベクターをpK4 [FERM BP-3731:ロドコッカス属プラスミドpRC004と大腸菌ベクターpHSG299(トランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子を含む)を連結させたもの(特開平5-64589、特開平5-68566参照)]としたプラスミドを作製した。プラスミドpBSK305を制限酵素XbaIとEcoRIで切断後、7.3kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10μlのpBSK305に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水76μl、制限酵素XbaIとEcoRIをそれぞれ2μl加え37℃にて2時間反応させた。

【0014】ベクターに用いたpK4断片は次のように作製した。10μlのpK4に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水78μl、制限酵素EcoRI 2μlを加え37℃で2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈殿させた後乾燥して50μlの滅菌水に溶解した。さらに、アルカリリフォスタファーゼ(宝酒造株式会社)1μl、10倍濃度緩衝液10μl、滅菌水39μlを加え65℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

【0015】J-1株H型ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む6.0kbDNA断片がpUC19ベクターに組み込まれたプラスミドpNHJ10H [特開平4-211379、Biochim. Biophys. Acta 1129, 23-33(1991)参照]を制限酵素BamHIで、切断後セルフライゲーションしてプラスミドpFY702を作製した。これを制限酵素EcoRVで切断後、リンカーpXbaI(宝酒造株式会社)とライゲーションし、さらに制限酵素EcoRIで切断後ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.1kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。7.3kb断片1μlと、ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.1kb断片1μlおよび、上記のXbaIとEcoRI切断pK41μlとをライゲーションキット(宝酒造株式会社)を用いて4℃で一晩反応させることによりプラスミドpSJ02を作製した(図1)。

【0016】3) ロドコッカス属細菌の形質転換および形質転換体のニトリルヒドラターゼ活性

ロドコッカスロドクロウスATCC12674株の対数増殖期の細胞を遠心分離により集菌し、氷冷した滅

菌水にて3回洗浄し、滅菌水に懸濁した。1μlのプラスミドpSJ002と菌体懸濁液10μlを混合し、氷冷した。チャンバーにDNAと菌体の混合液を入れ、遺伝子導入装置CET-200型(日本分光)により電場強度3.8kV/cm、パルス幅1ms、パルス回数20回で電気パルス処理を行った。電気パルス処理液を氷冷下10分間静置し、37℃で、10分間ヒートショックを行い、MYK培地(0.5%ポリペプトン、0.3%バクトモルトエキス、0.2%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 7.0))500μlを加え、26℃、3時間振温培養した後、75μg/mlカナマイシン入りMYK寒天培地に塗布し26℃、3日間培養した。

【0017】こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体(ATCC12674/pSJ002)をMYK培地(50μg/mlカナマイシン含有)10mlに接種し、30℃で24時間前培養した。この培養物1mlを培地100ml(1.5%グルコース、0.1%バクトイーストエキス、1%グルタミン酸ナトリウム、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05%硫酸マグネシウム、0.01%塩化コバルト、pH 7.2、50μg/mlカナマイシン含有)に加え、30℃で60時間培養した。集菌後、この菌体を50mMリン酸緩衝液(pH 7.7)に懸濁し、その一部を2.5%アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で10℃、10分反応させた。1N塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。その結果、ロドコッカス属細菌組換え体ATCC12674/pSJ002において、44mMのアクリルアミドの生成が認められた。

【0018】4) プラスミドpSJ023の作製

pSJ002には、遺伝子発現に必要ない領域がまだ多く残っているため、不要な領域を取り除いたプラスミドpSJ023を作製した。pSJ002を制限酵素EcoRIで部分分解後、さらにEcoRVで切断し末端平滑化処理をおこなった後、リンカーpEcoRI(宝酒造株式会社)とともにライゲーションを行い、プラスミドpSJ008を作製した。10μlのpSJ002に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水79.5μl、制限酵素EcoRI 10.5μlを加え37℃にて1時間反応させ、エタノール沈殿させた後乾燥して10μlの滅菌水に溶解した。さらにKlenow Fragment(宝酒造株式会社)2μl、10倍濃度緩衝液10μl、滅菌水78μlを加え37℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水10μlに溶解した。14.6kbのDNA断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。回収したDNA断片10μlに対し10倍濃度制限酵素緩衝液10μl、滅菌水78μl、制限酵素EcoRV 2μlを加え、2時間反応させ、フェノール処理、

エタノール沈殿を行った。次に、ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて、リンカー p E c o R I（宝酒造株式会社）と4°Cで一晩反応させた。この溶液で形質転換された大腸菌よりプラスミド p S J 0 0 8を得た。

【0019】また、プラスミド p B S K 3 0 2 から調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域、約3 kb E c o R V 断片を、0. 7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。制限酵素による切断は、10 μlのp B S K 3 0 2 に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素E c o R V 2 μlを加え37°Cにて2時間反応させることにより行った。この3 kb E c o R V 断片1 μlを、E c o R I で切断したp U C 1 1 8 とライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4°Cで一晩反応させることによりp U C 1 1 8への挿入を行い、p B S K 2 0 2 を作製した。プラスミド p B S K 2 0 2 を制限酵素E c o R I で切断後、3 kb 断片を0. 7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。

【0020】次に、プラスミド p S J 0 0 8 を制限酵素E c o R I で部分分解後、さらにアルカリフィオスタファーゼ（宝酒造株式会社）でB A P処理を行い、8. 72 kb 断片を0. 7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。これとp B S K 2 0 2 由来の3 kb E c o R I 断片とをライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4°Cで一晩反応させることにより、プラスミド p S J 0 2 3 を作製した（図2）。

【0021】5) プラスミド p S J 0 2 3 を含むロドコッカス属細菌形質転換体のニトリルヒドラターゼ活性工程3) と同様にして、プラスミド p S J 0 2 3 のロドコッカス ロドクロウスATCC12674への導入を行い組み換え体(ATCC12674/p S J 0 2 3)を作製した。こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体をMYK培地(50 μg/mlカナマイシン含有)10 mlに接種し、30°Cで24時間前培養した。この培養物1 mlを培地100 ml(1. 5%グルコース、0. 1%バクトイーストエキス、1%グルタミン酸ナトリウム、0. 05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0. 05%K<sub>2</sub>HP<sub>4</sub>、0. 05%硫酸マグネシウム、0. 01%塩化コバルト、pH 7.2、50 μg/mlカナマイシン含有)に加え、30°Cで60時間培養した。集菌後、この菌体を5

配列：

MetAlaGlyAlaAspValHisAlaGlnGlyGlyThrAsnArgArg	15
AlaArgIleLeuValValAspAspGluLysHisValArgThrMet	30
ValThrTrpGlnLeuGluSerGluAsnPheAspValValAlaAla	45
AlaAspGlyAspAlaAlaLeuArgGlnValThrGluSerAlaPro	60
AspLeuMetValLeuAspLeuSerLeuProGlyLysGlyGlyLeu	75
GluValLeuAlaThrValArgArgThrAspAlaLeuProLeuVal	90
ValLeuThrAlaArgArgAspGluThrGluArgIleValAlaLeu	105
AspLeuGlyAlaAspAspTyrValIleLysProPheSerProArg	120

0 mMリン酸緩衝液(pH 7.7)に懸濁し、その一部を2. 5%アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で10°C、10分反応させた。1 N塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したところ40 mMのアクリルアミドの生成が認められた。

【0022】6) ロドコッカス属細菌用発現ベクターの作製

工程4) で作製したプラスミド p S J 0 2 3 からニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域を取り除くことにより汎用的な発現ベクターを作製した。10 μlのp S J 0 2 3 に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素Xba I 2 μlを加え37°Cにて2時間反応させた。その後ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4°Cで一晩反応させた。次に、工程1-2) 同様大腸菌JM109のコンピメントセルを作製し、この反応液を10 μl加え、0°Cで30分放置した。その後、42°Cで30秒間ヒートショックを与え0°Cで2分間冷却後、SOC培地を0. 8 ml加え37°Cにて60分間振盪培養した。これを200 μlずつカナマイシン100 μg/ml含有のLB寒天培地にまき、37°Cで培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて工程1-3) 同様プラスミドの調製を行った。こうして得られたプラスミドをp R Y 0 1 と命名し、ロドコッカス属発現ベクターとした。

【0023】

【発明の効果】ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

【0024】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：244

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus

erythropolis)

株名：SK92-B1

GluLeuAlaAlaArgIleArgAlaValLeuArgArgThrThrAla	135
GluProProHisGluAlaAlaValGlnArgPheGlyAspLeuGlu	150
IleAspThrAlaAlaArgGluValArgLeuHisGlyIleProLeu	165
GluPheThrThrLysGluPheAspLeuLeuAlaTyrMetAlaAla	180
SerProMetGlnValPheSerArgArgLeuLeuLeuGluVal	195
TrpArgSerSerProAspTrpGlnGlnAspAlaThrValThrGlu	210
HisValHisArgIleArgArgLysIleGluGluAspProThrLys	225
ProThrIleLeuGlnThrValArgGlyAlaGlyTyrArgPheAsp	240
GlyGluArgAla	244

【0025】配列番号：2

配列の長さ：534

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

MetMetThrAspThrLeuProSerSerSerArgTrpThrLeuGlu	15
GlyProHisLeuGlnProLeuGlnGlyGluAlaLeuAlaAspLeu	30
HisAlaArgThrLeuGluMetIleThrSerGlyArgGluLeuHis	45
GluThrLeuGluValValAlaArgGlyIleGluGluLeuMetPro	60
GlyLysArgCysAlaIleLeuLeuLeuAspAsnThrGlyProVal	75
LeuArgCysGlyAlaAlaProThrMetSerAlaProTrpArgArg	90
TrpIleAspSerLeuValProGlyProMetSerGlyGlyCysGly	105
ThrAlaValHisLeuGlyGluProValIleSerTyrAspValAla	120
AspAspProLysPheArgGlyProPheArgAlaAlaAlaLeuHis	135
GluGlyIleArgAlaCysTrpSerThrProValThrSerGlyAsp	150
GlyThrIleLeuGlyThrPheAlaIleTyrGlySerValProAla	165
PheProAlaGlnGlnAspValAlaLeuValThrGlnCysThrAsp	180
LeuThrAlaAlaValIleThrThrHisLysLeuHisGlnAspLeu	195
SerMetSerGluGluArgPheArgArgThrPheAspSerAsnVal	210
ValGlyMetAlaLeuLeuAspGluSerGlySerSerIleArgVal	225
AsnAspThrLeuCysAlaLeuThrAlaAlaProProArgArgLeu	240
LeuGlyHisProMetGlnGluIleLeuThrAlaAspSerArgGlu	255
ProPheAlaAsnGlnLeuSerSerIleArgGluGlyLeuThrAsp	270
GlyGlyGlnLeuAspGlyArgIleGlnThrThrGlyGlyArgTrp	285
IleProValHisLeuSerSerIleSerGlyMetTrpThrThrGluArg	300
GluPheMetGlyPheSerValHisValLeuAspIleSerGluArg	315
LeuAlaAlaGluArgAlaArgGluGluGlnLeuGluAlaGluVal	330
AlaArgHisThrAlaGluGluAlaSerArgAlaLysSerThrPhe	345
LeuSerGlyMetThrHisGluValGlnThrProMetAlaValIle	360
ValGlyPheSerGluLeuLeuGluThrLeuAspLeuAspGluGlu	375
ArgArgGlnCysAlaTyrArgLysIleGlyGluAlaAlaLysHis	390
ValIleSerLeuValAspAspValLeuAspIleAlaLysIleGlu	405
AlaGlyAlaIleThrLeuGlnAspGluAspIleAspLeuSerGlu	420
GluValAlaThrIleValGluMetLeuGluProIleAlaArgAsp	435
ArgAspArgAspValCysLeuArgTyrValProProGlnThrPro	450
ValHisValCysSerAspArgArgValArgGluValLeuLeu	465
AsnIleValSerAsnGlyIleLysTyrAsnArgLeuGlyGlyVal	480
ValAspProProThrGlySerGlyAlaAlaArgProArgGlnThr	495
ArgAlaProAspTyrProAlaThrProThrThrAsnSerSerSer	510
ProSerThrGlyTrpGluSerArgProArgGlyCysLysGlyArg	525

11

12

GlySerValLeuArgSerProAlaArg

534

【0026】配列番号：3

配列の長さ：735

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\*起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)

株名：SK92-B1

\*

配列：

ATG	GCC	GGA	GCG	GAC	GTC	CAC	GCC	CAG	GGT	GGC	ACG	AAT	CGA	CGT	45
GCA	CGC	ATC	CTC	GTC	GTC	GAC	GAC	GAA	AAA	CAC	GTG	CGC	ACG	ATG	90
GTG	ACG	TGG	CAA	CTC	GAA	TCG	GAG	AAT	TTC	GAT	GTT	GTC	GCT	GCG	135
GCA	GAC	GGA	GAT	GCG	GCA	CTG	CGT	CAG	GTC	ACT	GAG	AGC	GCA	CCC	180
GAT	TTG	ATG	GTG	CTC	GAT	CTG	TCG	CTC	CCG	GGG	AAA	GGT	GGG	TTG	225
GAA	GTG	CTC	GCT	ACG	GTC	CGC	AGA	ACC	GAT	GCA	CTG	CCT	ATC	GTC	270
GTG	CTC	ACA	GCA	CGC	CGC	GAT	GAA	ACC	GAA	CGG	ATC	GTC	GCG	CTG	315
GAT	CTC	GGC	GCC	GAT	GAC	TAC	GTC	ATC	AAA	CCG	TTC	TCC	CCG	CGG	360
GAA	TTG	GCC	GCC	CGT	ATC	CGG	GCA	GTG	CTT	CGT	CGA	ACC	ACA	GCT	405
GAA	CCC	CCA	CAC	GAG	GCG	GCG	GTT	CAG	CGA	TTC	GGT	GAC	CTA	GAG	450
ATC	GAC	ACC	GCT	GCG	CGC	GAG	GTT	CGG	CTC	CAC	GGG	ATA	CCG	CTC	495
GAG	TTC	ACC	ACC	AAG	GAG	TTC	GAT	CTG	CTG	GCC	TAT	ATG	GCC	GCA	540
TCA	CCG	ATG	CAG	GTC	TTC	AGC	CGA	CGC	AGA	TTG	TTG	CTC	GAG	GTG	585
TGG	CGA	TCG	TCG	CCC	GAC	TGG	CAG	CAG	GAC	GCC	ACC	GTG	ACC	GAG	630
CAC	GTG	CAC	CGC	ATT	CGC	CGC	AAG	ATC	GAA	GAA	GAT	CCC	ACC	AAA	675
CCG	ACG	ATC	CTG	CAG	ACA	GTG	CGG	GGG	GCC	GGT	TAC	CGT	TTC	GAC	720
GGA	GAG	CGT	GCA	TGA											735

【0027】配列番号：4

配列の長さ：1605

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\*起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)

株名：SK92-B1

配列：

ATG	ATG	ACC	GAC	ACA	CTG	CCC	TCC	TCG	TCC	CGT	TGG	ACC	CTT	GAA	45
GGC	CCG	CAT	CTC	CAG	CCG	CTG	CAG	GGT	GAG	GCC	CTG	GCG	GAT	CTC	90
CAC	GCC	CGT	ACG	CTC	GAG	ATG	ATC	ACT	TCC	GGG	AGA	GAA	TTG	CAC	135
GAG	ACA	CTC	GAG	GTG	GTC	GCC	CGC	GCG	ATC	GAG	GAA	CTG	ATG	CCG	180
GGC	AAA	CGT	TGC	GCA	ATT	CTG	TTG	CTC	GAC	AAC	ACC	GGA	CCG	GTA	225
TTG	CGC	TGC	GGC	GCG	GCC	CCA	ACA	ATG	AGC	GCG	CCG	TGG	CGC	CGG	270
TGG	ATC	GAC	AGC	CTC	GTC	CCT	GGT	CCG	ATG	TCG	GGT	GCG	TGC	GGC	315
ACA	GCG	GTT	CAC	CTC	GGC	GAG	CCG	GTT	ATT	TCC	TAT	GAC	GTG	GCC	360
GAT	GAC	CCG	AAA	TTC	CGC	GCG	CCC	TTC	CGC	GCC	GCA	GCC	CTC	CAC	405
GAG	GGC	ATA	CGT	GCC	TGC	TGG	TCC	ACC	CCC	GTC	ACA	AGC	GGA	GAC	450
GGC	ACG	ATC	CTC	GGC	ACT	TTC	GCG	ATC	TAC	GGA	TCC	GTG	CCG	GCG	495
TTC	CCC	GCA	CAA	CAG	GAC	GTT	GCC	CTG	GTC	ACC	CAA	TGC	ACC	GAC	540
CTG	ACC	GCT	GCC	GTC	ATC	ACC	ACC	CAC	AAA	CTT	CAT	CAA	GAT	CTG	585
AGC	ATG	AGC	GAG	GAG	CGG	TTC	CGA	CGC	ACC	TTC	GAT	TCC	AAT	GTC	630
GTC	GGC	ATG	GCA	CTT	CTC	GAC	GAA	TCC	GGC	TCC	AGC	ATC	CGC	GTC	675
AAC	GAC	ACC	CTG	TGC	GGC	TTG	ACC	GCA	GCT	CCG	CCA	CGG	CGC	CTC	720
CTC	GGC	CAC	CCC	ATG	CAG	GAG	ATA	CTC	ACC	GCC	GAC	TCC	CGG	GAA	765
CCG	TTC	GCC	AAT	CAG	TTG	TCC	ATC	CGT	GAG	GGA	TTG	ACC	GAC	810	
GGC	GGA	CAG	CTC	GAC	GGG	CGA	ATC	CAA	ACC	ACC	GGA	GGT	CGG	TGG	855
ATT	CCG	GTG	CAC	CTG	TCC	ATC	AGC	GGT	ATG	TGG	ACC	ACG	GAG	CGG	900

13

GAG	TTC	ATG	GGA	TTC	AGC	GTC	CAT	GTC	CTG	GAC	ATC	TCC	GAG	CGC	945
CTG	GCC	GCC	GAA	CGC	GCC	CGC	GAG	GAA	CAA	CTC	GAG	GCC	GAG	GTT	990
GCC	CGC	CAT	ACC	GCG	GAG	GAA	GCC	AGT	CGC	GCC	AAG	TCC	ACG	TTC	1035
CTG	TCC	GGC	ATG	ACG	CAC	GAG	GTC	CAA	ACG	CCC	ATG	GCC	GTT	ATC	1080
GTC	GGA	TTC	AGT	GAG	CTA	CTC	GAG	ACG	CTG	GAC	CTG	GAT	GAA	GAA	1125
CGT	CGT	CAG	TGC	GCC	TAC	CGC	AAG	ATC	GGC	GAA	GCC	GCG	AAA	CAC	1170
GTG	ATC	TCC	CTG	GTC	GAC	GAC	GTT	CTC	GAT	ATA	GCC	AAG	ATC	GAA	1215
GCC	GGC	GCT	ATC	ACT	CTG	CAG	GAC	GAA	GAC	ATC	GAC	CTG	TCC	GAA	1260
GAA	GTT	GCC	ACC	ATC	GTG	GAG	ATG	CTC	GAG	CCC	ATC	GCC	CGT	GAC	1305
CGT	GAC	CGT	GAC	GTC	TGC	CTG	CGG	TAC	GTC	CCG	CCG	CAG	ACA	CCG	1350
GTG	CAC	GTG	TGC	TCG	GAC	CGG	CGG	CGG	GTG	CGG	GAA	GTG	CTG	CTC	1395
AAC	ATC	GTC	TCC	AAC	GGG	ATC	AAG	TAC	AAT	CGG	CTC	GGT	GGT	GTC	1440
GTC	GAC	CCC	CCA	ACA	GGA	TCA	GGG	GCT	GCT	CGT	CCG	CGT	CAG	ACG	1485
AGG	GCC	CCG	GAC	TAC	CCA	GCG	ACG	CCG	ACG	ACG	AAC	TCT	TCG	AGC	1530
CCT	TCA	ACC	GGC	TGG	GAG	TCG	AGG	CCA	CGG	GGG	TGC	AAG	GGT	CGG	1575
GGC	TCG	GTC	TTG	CGC	TCT	CCC	GCG	CGC	TGA						1605

【0028】

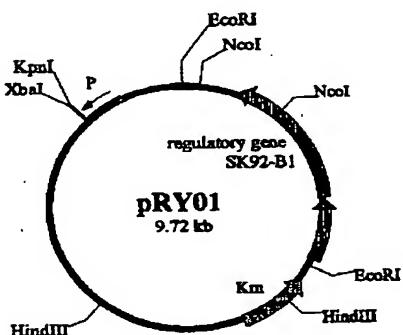
【図面の簡単な説明】

【図1】組換え体pSJ002の作製図

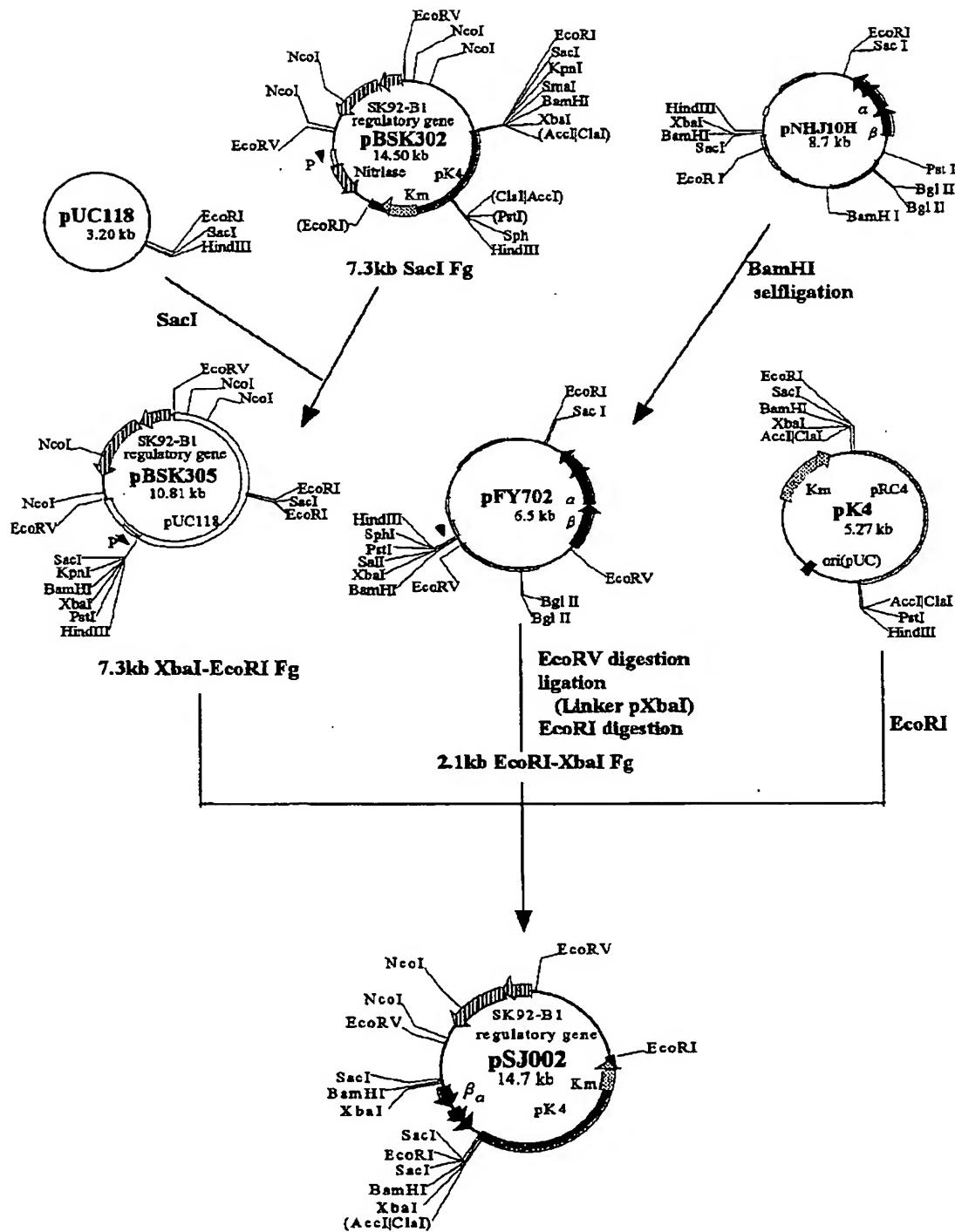
【図2】組換え体pSJ023の作製図

【図3】発現ベクターpRY01の制限酵素地図

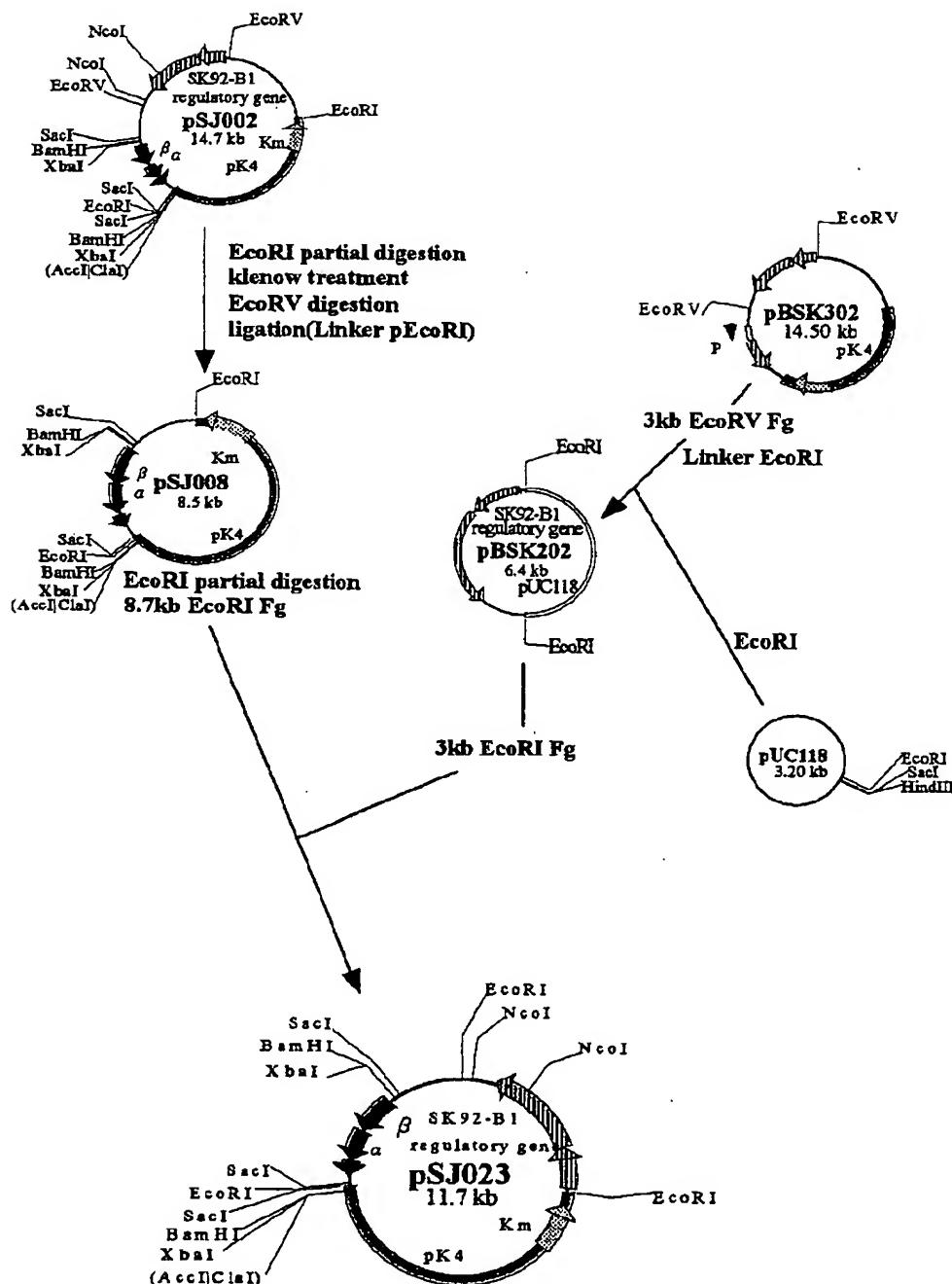
【図3】



【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.CI.<sup>6</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:01)